

ÉRTEKEZÉSEK EMLÉKEZÉSEK

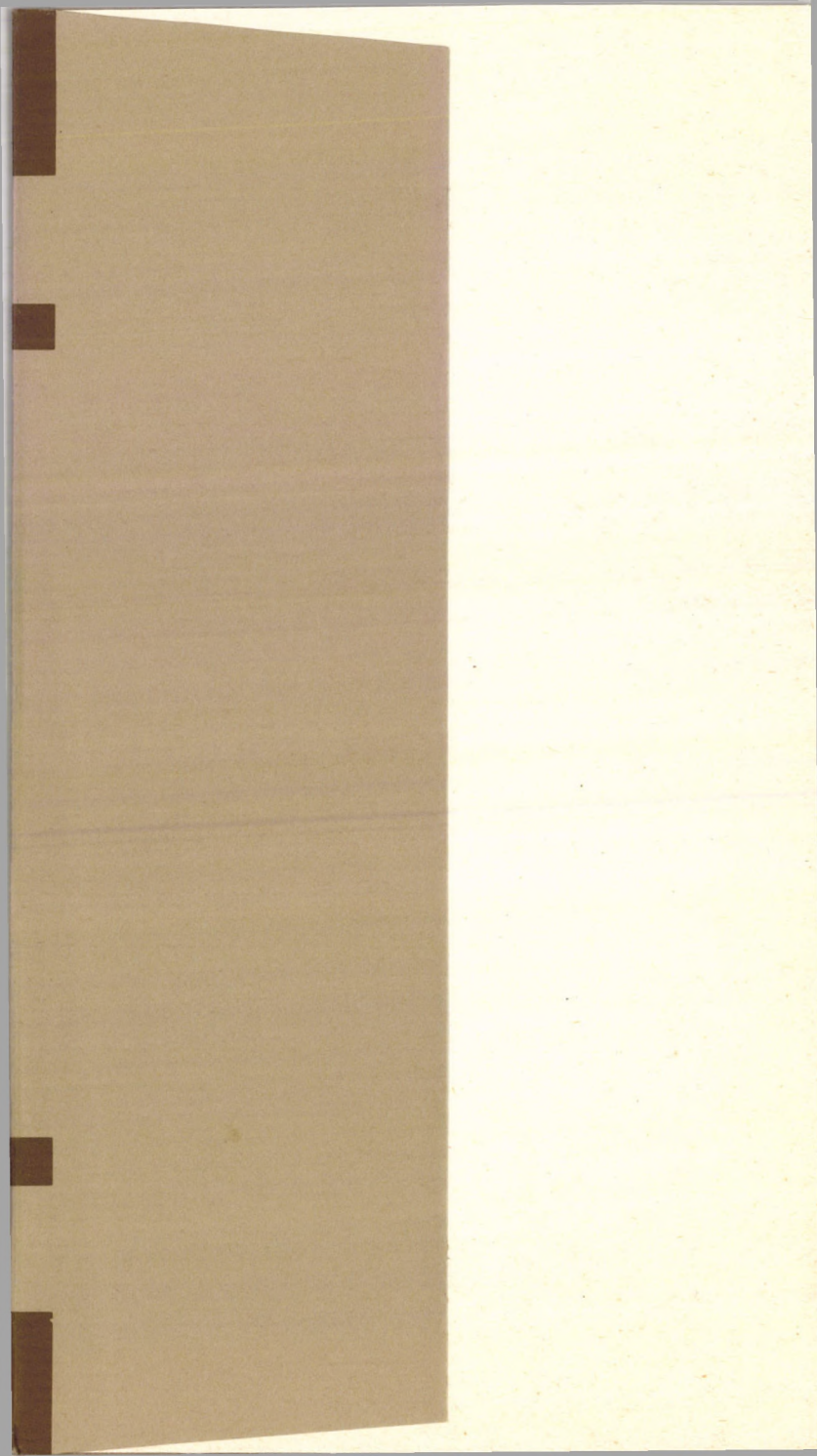
ROMHÁNYI GYÖRGY

TOPOOPTIKAI REAKCIÓK
ÉS SZEREPÜK
A BIOLÓGIAI
ULTRASTRUKTÚRA-
KUTATÁSOKBAN



70

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST



ÉRTEKEZÉSEK
EMLÉKEZÉSEK

ÉRTEKEZÉSEK EMLÉKEZÉSEK

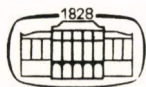
SZERKESZTI
TOLNAI MÁRTON

ROMHÁNYI GYÖRGY

TOPOOPTIKAI REAKCIÓK
ÉS SZEREPÜK
A BIOLÓGIAI
ULTRASTRUKTÚRA-
KUTATÁSOKBAN

AKADÉMIAI SZÉKFOGLALÓ

1983. MÁRCIUS 25.



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

A kiadványsorozatban a Magyar Tudományos Akadémia 1982.
évi CXLII. Közgyűlése időpontjától megválasztott rendes és
levelező tagok székfoglalói — önálló kötetben — látnak
napvilágot.

A sorozat indításáról az Akadémia főtítkárának 22/1/1982.
számú állásfoglalása rendelkezett.

ISBN 963 05 4736 8

© Akadémiai Kiadó, Budapest 1988 — Romhányi György

A kiadásért felelős az Akadémiai Kiadó
és Nyomda Vállalat főigazgatója
Felelős szerkesztő: Sente László
Műszaki szerkesztő: Kiss Zsuzsa
Terjedelem: 1,18 (A/5) ív + 12 oldal melléklet
HU ISSN 0236-6258
88.17010 Akadémiai Kiadó és Nyomda Vállalat
Felelős vezető: Hazai György

Printed in Hungary

A fénymikroszkóp feloldási képességének ismert ($\lambda/2$) határa késztetett arra, hogy polarizációs mikroszkópiával kezdjek foglalkozni, amely indirekt módon micelláris rendezettség felismerését teszi lehetővé, így szubmikroszkópos szerkezetelemzés lehetőségét ígérte abban az időben, amikor az elektronmikroszkóp még nem volt ismert. Az elektronmikroszkópia térfoglalása nem szüntette meg a polarizációs mikroszkópia jelentőségét a biológiai ultrastruktúrák vizsgálatában.

Az elektronmikroszkópia ugyanis a makromolekuláris dimenziók világáról tud információt nyújtani, míg a polarizációs optika jelenségeinek színterét az elektronpályák rendezett irányú deformitásai képezik, így elvileg is mélyebb dimenziókig képes behatolni, mint az elektronmikroszkópia. Így néha olyan strukturális információkat tud nyújtani, amire az elektronmikroszkópia elvileg sem képes (pl. a lipoid molekulák transzverzális rendezettsége a biomembránokban, a szénhidrátok molekuláris orientációja a biológiai struktúrákban vagy a nukleotid bázisok síkjának haránt irányú rendezettsége a DNS fonalmolekuláiban).

A polarizációs optikai elemzés hátránya egyrészt, hogy indirekt jellegű, vagyis az optikai jelenségek elméletileg megalapozott szerkezeti értelmezését teszi szükségessé (ez képezi leg-

inkább akadályát a szélesebb körű elterjedésének), másrészt hogy az anizotrópia optikai jelei a mikroszkópban csak akkor észlelhetők, ha az elektrondeformítások területei a szubsztrátumban egyöntetűen meghaladják a fény-mikroszkóp feloldási határát.

A polarizációs mikroszkópos biológiai szerkezetkutatások vonatkozásában az a helyzet, hogy az erősebben kettőstörő szövetkomponensek (mielin, kollagén, izom keratin) finomabb szerkezeti felépülését már Schmidt [26] – a polarizációs mikroszkópia nagymestere – kiterjedt vizsgálatai lényegében tisztázták. A gyengébben kettőstörő szöveti elemek polarizációs optikai vizsgálata pedig nagy nehézségekbe ütközik vagy meg sem közelíthető. Ilyen vonatkozásban nyertek jelentőséget a vizsgálataim során kifejlesztett topo-optikai reakciók, amelyek azáltal jönnek létre, hogy színtelen anyagok vagy festékek molekulái a rejtett micelláris struktúrákra orientáltan kapcsolódva, azok gyenge kettős törését sokszorosán felerősítik, így a rejtett micelláris szerkezetek felismerhetővé és analizálhatóvá válnak. A reakciók megjelölésére 1969-ben [6] a topooptikai megjelölést vezettem be. Ezt a fogalmat az irodalom széles körben átvette.

Szükségessé vált továbbá fogalmilag is elkülöníteni a topooptikai reakciók típusait. Így megkülönböztettem az *additív* és *inverzív* reakciókat. Az előbbiben az enyhe kettős törés optikai jellegének megváltozása nélkül erősö-

dik fel, míg az inverzív reakcióban a kettős törés nemcsak felerősödik, hanem optikai jellegében is megfordul. Ez a terminológia az észlelteket világos fogalmazása szempontjából gyakorlatilag hasznosnak bizonyult.

Jelen előadásomban az általam kifejlesztett és használt topooptikai reakciókat egyes szerkezeti elemek példáján kívánom bemutatni, egybekötve azok ultrastrukturális értelmezésével.

Kollagénspecifikus topooptikai reakciók

Ebner észlelte, hogy fenolban a kollagénrostok eredeti pozitív kettős törése negatívba fordul át [6]. A reakció reverzibilis, oldószerrel könnyen megszüntethető, majd újra kiváltható. A fenolreakció a kollagének abszolút specifikus optikai reakciója. Ebner ugyan ezt a reakciót már a múlt század végén ismertette, de iránta csak az 1950-es években, a fellendülő finomszerkezetani kollagénkutatások során nyilvánult meg érdeklődés. A reakció elemzése során kimutattam (1. ábra; az ábrák a kötet végén találhatók), hogy a kollagén fenolreakciója szulfatálás után, ami a kollagén hidroxiprolin OH-csoportjait blokkolja, megszűnik. Deszulfatálás után a kollagén fenolreakciója újra visszatér. Ebből nyilvánvaló, hogy a fenolgyűrűk a kollagén hidroxiprolin szabad OH-csoportjaira kapcsolódva, a kollagénmolekula

hosszára merőlegesen rendeződve helyezkednek el. Ez magával vonja az eredeti pozitív kettős törés inverzióját negatívba. A fenolreakció tehát a kollagén specifikus inverzív topooptikai reakciója.

*Kongóvrös festés által előidézett
inverzív topooptikai reakció
mint kollagénspecifikus topooptikai reakció*

A reakció molekuláris vázlatát a 2. ábra szemlélteti. A kongóvrössel festett kollagénrostok ellentétes optikai sajátságot mutatnak a lefedő közeg apoláris (kanadabalzsam) vagy poláris (gumiarábikum) jellegétől függően. Apoláris közegben, ahol nem érvényesülnek az elektromos töltések, a kollagénrostok erős pozitív kettős törést mutatnak, az additív optikai reakciónak megfelelően (2. ábra, a). Ez arra utal, hogy a pálcika alakú, 2,1 nm hosszú festékmolekulák párhuzamosan illeszkednek a kollagén felszínére. Ezzel szemben a gumiarábikum poláris közegében (2. ábra, b) a kongóvrössel festett kollagénrostok elvesztik pozitív kettős törésüket: izotrópiát vagy enyhe negatív kettős törést mutatnak. Tehát inverzív topooptikai reakcióval állunk szemben. Az optikai jelek arra utalnak, hogy a pálcika alakú festékmolekulák nem tudnak párhuzamosan illeszkedni a kollagén felszínére, hanem egyik végükkel megkötődnek, másik végükkel pedig

repulziót szenvednek. Ennek folytán a festékmolekulák a rost irányára merőlegesen állnak. A festékmolekulák ezen orientációja vezet az eredeti pozitív kettős törés izotrópiába való csökkenéséhez vagy enyhe negatív kettős töréshez [28].

A kollagénmolekula felszíne tehát nem képes fogadni párhuzamos asszociációban a 2,1 nm hosszú, mindkét végén negatív töltéssel rendelkező kongóvörös-molekulákat, nyilván azért, mert nincsenek megfelelő távolságban ismétlődő festékkötő pozitív oldalcsoportok a felszínen.

A gyakorlat azt mutatta, hogy a kongóvörös által előidézett inverzív topooptikai reakció (gumiarábikumban) specifikus a kollagén ultrastruktúrájára. Más rostelemeken ilyen reakció nem figyelhető meg. Ezért a reakció hasznosan értékesíthető diagnosztikai célokra, pl. amiloid depositumok szelektív felismerésére [22, 12, 20, 23] vagy finomszerkezettani kutatások céljára [25], amikor a kollagénrostok zavaró kettős törését ki akarjuk küszöbölni (3. ábra, a és b).

Kollagénspecifikus topooptikai reakció perjodát-szulfatálás után toluidinkék festéssel

Ha perjodátos kezelés után szulfatált metseteket festünk 1,0 pH-jú toluidinkékkel, akkor a kollagénrostok intenzív bazofiliát és

negatív kettős törést mutatnak, ami rendkívül sűrű és harántúl rendezett festékmolekula-asszociációra utal a kollagén felszínén. A festékmolekulák a hidroxiprolin OH-csoportjaihoz kapcsolódott szulfátgyökökhöz kötődnek, ezért még 1,0 pH-nál is intenzív bazofilia észlelhető. A reakció molekuláris mechanizmusát a 4. ábra tünteti fel, amely szerint a perjód-savas előkezelés után a cukorkomponensek vicinális OH-csoportjai aldehiddé alakítva már nem vesznek részt a szulfatálásban, így gyakorlatilag csak a hidroxiprolin OH-gyökei jönnek számításba (a C-6 szulfatált OH-csoportjaihoz kötött toluidinkék-molekulák, a köztük levő nagy távolság miatt, már nem vesznek részt az orientált festékmolekula-aggregációban; lásd az 5. ábrát). A reakció kollagénre specifikus, és így, eltekintve elméleti vonatkozásaitól, igen hasznos kollagénkomponensek felderítésére és kvantitatív meghatározására ott, ahol azok erősen maszkírozva vannak jelen (porcállomány, basalmembránok; lásd a 6. ábrát). A festési effektus vizuálisan erősen metakromázis, ami arra utal, hogy a festékmolekulák 0,5 nm távolságon belül vannak egymástól [21].

A metakromázia mint inverzív topooptikai festési reakció

A biológiai morfológia legtöbbet tanulmányozott sajátos festési reakciója a metakromázia, amelynél pl. toluidinkék festés után egyes szerkezetelemek metakromáziás (piros) színben tűnnek fel. Ennek strukturális magyarázatát számosan keresték. Feltételezték, hogy a színváltozás hátterében a festékmolekulák micelláris aggregációja áll, amit a szubsztrátumon sűrűn elhelyezett, negatív festékkötő gyökök idéznek elő. A reakció alapját képező strukturális háttér tanulmányozását gátolta az, hogy a reakció rendkívül labilis, nem dehidrálható, ezért a festési effektust még magában a festékoldatban ajánlották vizsgálni. Nem sikerült permanens készítményeket létrehozni, és így nem került sor a metakromáziás reakció polarizációs optikai tanulmányozására sem, ami kimutathatta volna az elméletileg feltételezett micelláris festékaggregáció létezését a metakromáziás struktúrákon.

Vizsgálataimban [4, 21] kimutattam — alkalmas objektumon elvégezve a reakciót, ahol a metakromázia intenzív (pl. cornea, porc) —, hogy a metakromázia valóban orientált festékkötés eredménye, éspedig haránt irányú rendezettséggel a lineáris kromotrop alapstruktúrára. A cornea pozitív kettős törésű rostjai nyomban negatív kettőstörőkké válnak toluidinkék festés során, már a festékoldatban vizs-

gálva is. A metakromáziás reakció stabilizálását is sikerült elérni, a membránok optikai tanulmányozása során felismert, stabilizáló hatású festés utáni ferricianidos kezeléssel. Így igen gyenge metakromáziás effektusok felismerése és kvantitatív jellemzése a kettős törés mérésével vált lehetségessé (ún. metakromázia vagy anizotrópia index). A metakromázia tehát a lineáris kromotrop makromolekuláris szerkezetek inverzív topooptikai festési reakciója. Ahol tehát metakromázia állapítható meg, ott micellárisan rendezett alapstruktúrát kell feltételezni.

Modellkísérletekben bebizonyítottuk, hogy a metakromázia kialakulásához a lineárisan rendezett festékkötő gyököknek 0,5 nm távolságon belüli sűrűsége szükséges (5. ábra, a és b).

Az érfali rugalmas rostok topooptikai reakciói

Vizsgálataim során váratlanul jutottam a rugalmas rostok micelláris ultrastruktúrájára utaló kettős törés felismerésére [1]. A sejtmagokban a DNS rejtett anizotrópiájának magyarázatát keresve az igen magas törésmutatójú ($n = 1,580$) anilinnel fedtem le a metszeteimet, úgy gondolva, hogy ilyen törésmutató mellett talán sejthetővé válik a sejtmagok DNS-tartalmának rejtett anizotrópiája. A lelet meglepő volt, mert bár a sejtmagok továbbra

is izotropok maradtak, de a rugalmas rostok intenzív kettős töréssel tűntek fel, a rostok tengelyében húzódó jellegzetes izotrop sávval (7. ábra). Az optikai kép ultrastrukturálisan csavaros, fonalszerű szerkezetként értelmezhető (8. ábra). A centrális izotrop sáv a kereszteződő rostok anizotrópiájának kompenzációja által jön létre. Az érfali rugalmas rostok tehát nem homogének (izotropok), mint ahogy ezt még egy legújabb közlemény is állítja [27]. Az elektronmikroszkópban csak nehezen sikerült párhuzamosan rendezett, szemcsés, fonalszerű szerkezet nyomait kimutatni, amit egyesek műterméknek is tartanak [27].

*Bovin ligamentum nuchae rugalmas
rostjai anilinben [5, 25]*

A rostok jellemző háromkötegű anizotrópiát mutatnak (9. ábra). A két külső anizotrop sáv a rostirányra optikailag negatív jellegű, ez harántul (cirkulárisan) futó micelláris szerkezetre utal. A centrális anizotrop sáv a rostirányra pozitív optikai jellegű, a rost tengelyében lévő hosszirányú micelláris szerkezetnek megfelelően. A 10. ábra feltünteti a ligamentum rugalmas rost szerkezeti vázlatát az anizotrópiája alapján. A két paramedián izotrop sáv a két egymással ellentétes optikai szerkezet egymást átfedő határzónájában keletkezik, optikai kompenzáció révén. A ligamentum

nuchae rostok komplex struktúrája mechanikai funkcionális szempontból is előnyösnek látszik, mert a külső cirkuláris réteg elhajlást és megnyúlásokat tesz lehetővé, míg a középben lévő longitudinális micelláris szerkezet hosszirányban erősíti a rostállományt.

A rugalmas rostok kongofiliája és a kongóvörös festés okozta anizotrópiája [25]

A kongóvörössel festett rugalmas rostok közepes erősségű kettős törést mutatnak. Ez azonban csak akkor észlelhető, ha a metszeteiket gumiarábikummal fedjük le, mert ilyenkor a kollagénrostok inverzív optikai reakciójuk miatt izotropok, és így a rugalmas rostok anizotrópiájának a felismerése lehetségessé válik (3. ábra, b). Egyébként, a szövettani laboratóriumokban alkalmazott kanadabalzsamos lefedéskor az erősen kettőstörő kollagénrostok mindent elfednek. Ezért nem ismerték fel a rugalmas rostok kongóvörös által előidézett anizotrópiáját. A rugalmas rostok anizotrop szerkezetének legegyszerűbb kimutatási módja: kongóvörös festésű metszeteiket gumiarábikummal lefedni és azt beszáradni engedni.

A rugalmas rostok kongóvörös okozta kettős törése alapján fel kell tenni, hogy az elasztinban kongoaffin molekuláris szegmensek lineáris orientációiban vannak jelen, bár a mérsékelt fokú anizotrópia a rendezettség köze-

pes fokára utal. Biokémiai adatok szerint az elasztinnak meghatározott makromolekuláris szegmensei mutatnak szelektív kongoaffinitást [25]. A kongóvörös okozta kettős törésből arra kell következtetni, hogy éppen ezen kongofil molekuláris szegmensek meghatározott lineáris orientációban vannak jelen az elasztinban.

Megemlítendő, hogy amilyen egyszerű módszerrel a polarizációs optikai elemzés ki tudja mutatni a rugalmas rostok komplex, csavaros, fonalszerű szerkezetét, olyan valószínűtlennek látszik, hogy az elektronmikroszkópia, amely csak rost fragmentumokat magában foglaló ultravékony metszeteket igényel, képes lehet a leírt komplex micelláris szerkezetek felismerésére.

*Topooptikai reakciók
a biomembránok ultrastruktúrájának
tanulmányozásában*

A topooptikai reakciók több vonatkozásban is eredményesen használhatók [7, 8, 9, 10]. Így a membrán lipoid réteg detektálásában, ahol ennek eredeti optikai effektusa olyan gyenge, hogy topooptikai reakció nélkül nem ismerhető fel (pl. a vörösvérsejt membrán), továbbá az ergastoplasma membránhoz asszociált ribonukleinsav-komponensek molekuláris orientációjának felderítésére, valamint szénhidrát-

komponensek (oligo- és poliszacharidok) molekuláris orientációjának elemzésére [16]. E kérdéseket csupán néhány kiragadott példán vázoltam, és a hazai irodalomban könnyen hozzáférhető, részletes közleményekre utalok [22].

A biomembránok negatív kettős törése a lipoid réteg függvénye. A kettős törés néha olyan gyenge, hogy még a legjobb optikával rendelkező polarizációs mikroszkópban sem észlelhető (pl. vörösvérsejt membrán). Ilyenkor ez nagymértékben felerősíthető orientált festékkötési reakció, pl. toulidinkék festés által.

Itt fontos lépés volt a felismerés, hogy a labilis orientált festékkötés stabilizálható, és egyben az optikai effektus ferricianidos utókezeléssel nagyban felerősíthető. Így vált lehetővé a membrán lipoid struktúrák felismerése és elemzése ott, ahol ezek gyenge anizotrópiájuk miatt gyakorlatilag nem voltak megközelíthetők (11., 12., 13. ábra). A toulidinkékmolekulák fenotiazin gyűrűikkel a lipoidok zsírsavláncai közé illeszkednek, azokkal párhuzamosan, és így idézik elő a nagyfokú kettőstörés-emelkedést. Lipoidkioldás után a festékkötés mértéke nem csökken, de az optikai effektus elmarad. Ez arra utal, hogy a festékmolekulák orientációjában a lipoidok játszanak szerepet, azok hiányában a megkötött festékmolekulák dezorientáltak vannak jelen.

*A klórpromazin orientált asszociációja
biomembránokkal [22]*

Figyelemre méltó, hogy a toluidinkékkal rokon szerkezetű, fenotiazin vázat tartalmazó klórpromazin nagyfokú affinitást mutat biomembránok szerkezetébe való orientált beilleszkedésre. Ennek során a lipoidok okozta kettős törés gyorsan lecsökken izotrópiáig, vagy enyhe inverziót szenved (14. ábra). Az optikai jelenség arra utal, hogy a klórpromazin fenotiazin vázával harántul illeszkedik be a lipoid zsírsavláncok közé (ellentétesen, mint a toluidinkék-molekulák; lásd a 15. ábrát), és azok rendezettségét megzavarja, ami által a membrán kettős törése lecsökken, vagy inverziót szenved. A reakció natív vagy formalinrögzített festetlen membránokon egyformán létrejön, és teljesen reverzibilis, vagyis klórpromazin okozta kettőstörés-csökkenés nem szerkezeti destrukció eredménye, hanem reverzibilis asszociáció révén jön létre (16. ábra). Feltehető, hogy a klórpromazin nyugtató hatása is ezen reverzibilis lipoidstruktúra-perturbáció eredményeként jön létre, in vivo mint univerzális topooptikai membránhatás.

*Oligo- és poliszacharid-komponensek
molekuláris orientációja biomembránokban*

A biológiai struktúrákban a szénhidrát-komponensek jelenlétének nagy funkcionális jelentőséget kell tulajdonítani. Az a kérdés, hogy az oligo- és poliszacharidláncoknak van-e meghatározott orientációja a biomembránokban vagy más biológiai struktúrákban, eddig nem volt eldönthető, mert nem állt rendelkezésre erre megfelelő módszer. Az elektronmikroszkópia ultrastrukturálisan ugyan ki tudja mutatni ezen komponensek jelenlétét és mikrostrukturális lokalizációját a szövetekben, de molekuláris orientációjukról nem tud információt nyújtani. E vonatkozásban merőben új lehetőségeket nyújt a polarizációs optikai analízis. A reakció molekuláris mechanizmusát a 17. ábra tünteti fel. Ez a reakció igen nagy érzékenységgel detektálja a szénhidrát-láncok jelenlétét és molekuláris orientációját. Az aldehid-biszulfit-toulidinkék (ABT) reakció kiderítette, hogy a biológiai membránokban jelenlevő poliszacharidláncok (valószínűleg funkcionálisan is fontos) magas rendezettségben vannak jelen (lásd a 18. és 19. ábrákat). A reakció minimális mennyiségben jelenlevő szénhidrát-komponensek és azok molekuláris orientációjának a felismerését teszi lehetővé, ezért igen értékes finomszerkezettani kutatási módszerként értékelhető.

Az *ABT* reakció gyakorlati diagnosztikai célra is hasznos, felhasználható a szövetekben levő kórokozó mikrobák felkutatására (lásd a 20. ábrát). Mikroorganizmusok: gombák és baktériumok falában jelentős mennyiségben vannak jelen nagyfokú orientációban szénhidrátkomponensek [19]. Az *ABT* reakció diagnosztikai effektivitása felülmúlja az eddig rendelkezésre álló egyéb morfológiai módszereket, és további lehetőséget nyújt a szénhidrátkomponensek molekuláris orientációjának szélesebb körű tanulmányozására a biológiai struktúrákban.

IRODALOM

1. ROMHÁNYI, GY.: Submicroscopic structure of elastic fibres as observed in the polarization microscope. *Nature* 182, 929 (1958).
2. ROMHÁNYI GY.: A polarizációs mikroszkópia szerepe a szubmikroszkópos szerkezetkutatásban. *Morph. Ig. Orv. Szle* 2, 161 (1962).
3. ROMHÁNYI GY.: Mikrostruktúra és functio együttes kutatásának jelenlegi eredményeiről az irodalomban és hazánkban. *MTA Biol. Tud. Oszt. Közl. VI*, 31 (1963).
4. ROMHÁNYI, GY.: Über die submikroskopische strukturelle Grundlage der metachromatischen Reaktion. *Acta Histochem.* 15, 201 (1963).
5. ROMHÁNYI, GY.: On the submicroscopic structure of the elastic fibres of the bovine ligamentum nuchae as revealed by the polarization microscope. *Acta Morph.* 13, 397 (1965).
6. ROMHÁNYI GY.: A kötőszövet sejtközi állományának ultrastruktúrájáról topooptikai reakciók polarizációs optikai vizsgálata alapján. *Doktori Értekezés, Pécs*, 1966.
7. ROMHÁNYI, GY.—DEÁK, GY.: Ultrastructure of the pancreatic ergastoplasm as revealed by polarizations-optical, photometric and electron microscopic studies. *Acta Biol. Suppl.* 17, 385 (1966).
8. ROMHÁNYI, GY.—DEÁK, GY.: Ultrastructure of the ergastoplasm of pancreas acinar cells as revealed by topo-optical staining reactions. *Acta Biochim. Biophys.* 2, 115 (1967).
9. ROMHÁNYI, GY.—DEÁK, GY.: Dependence of the topo-optical staining reaction of the ergastoplasm of the liver cells on the redox state. *Acta Histochem.* 33, 308 (1969).
10. ROMHÁNYI, GY.—DEÁK, GY.: On the ultrastructural organization of biological membranes as shown by topo-optical staining reactions. *Acta Morph.* 17, 245 (1969).
11. ROMHÁNYI, GY.: Selective differentiation between amyloid and connective tissue structures based on the collagen specific topo-optical staining reaction with congo red. *Virch. Arch. A.* 354, 209 (1971).

12. ROMHÁNYI, GY.: Differences in ultrastructural organization of amyloid as revealed by sensitivity or resistance to induced proteolysis. *Virch. Arch. A.* 357, 29 (1972).
13. ROMHÁNYI, GY.—BUKOVINSZKY, A.—DEÁK, GY.: Sulfation as a collagen-specific reaction. The ultrastructure of sulfat collagen, basement membranes and reticulin fibers as shown by topo-optical reactions. *Histochem.* 36, 123 (1973).
14. ROMHÁNYI, GY.: Topo-optical reactions in ultrastructural research. *Morph. Ig. Orv. Szle* 18, 292 (1973).
15. ROMHÁNYI, GY.—MOLNÁR, L.: Optical polarization indicates linear arrangement of rhodopsin oligosaccharide chain in rod disk membranes of frog retina. *Nature* 249, (1974).
16. ROMHÁNYI, GY.—DEÁK, GY.—FISCHER, J.: Aldehyd bisulfite-toluidine blue (ABT) staining as a topo-optical reaction for demonstration of linear order of vicinal OH groups in biological structures. *Histochem.* 43, 333 (1975).
17. ROMHÁNYI GY.: A biológiai membránok ultrastruktúrájáról optikai analízisek tükrében. *MTA Biol. Oszt. Közl.* 181, 1 (1975).
18. ROMHÁNYI GY.—NÉMETH Á.—DEÁK GY.: A vicinális OH-csoportok lineáris rendezettségének topooptikai kimutatása aldehyd-biszulfit-toluidinkék (ABT) reakcióval. *Morph. Ig. Orv. Szle* 16, 137 (1976).
19. FISCHER J.—ROMHÁNYI GY.: Baktériumok és gombák kimutatása szövetekben topooptikai aldehyd-biszulfit-toluidinkék (ABT) reakcióval. *Morph. Ig. Orv. Szle* 16, 137 (1976).
20. ROMHÁNYI GY.: Amyloid lerakódások szelektív feltűntetése és ultrastrukturális különbségeik elemzésének módszertani lehetőségei. *Morph. Ig. Orv. Szle* 16, 145 (1976).
21. FISCHER, J.—ROMHÁNYI, GY.: Optical studies on the molecular sterical mechanism of metachromasia. *Acta histochem. (Jena)* 59, 29 (1977).
22. ROMHÁNYI, GY.: Ultrastructure of biomembranes as shown by topo-optical reactions. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 29, 311 (1978).

23. ROMHÁNYI, GY.: Selektive Darstellung sowie methodologische Möglichkeiten der Analyse Ultrastruktureller Unterschiede von Amyloidablagerungen. *Zbl. allg. Path.* 123, 9 (1979).
24. GALLYAS F.—ROMHÁNYI GY.—FISCHER J.: Módszerek különböző érfali szerkezetelemek szelektív feltüntetésére. *Morph. Ig. Orv. Szle* 20, 107 (1980).
25. ROMHÁNYI, GY.: The characteristic three-banded birefringence of ligamentum nuchae elastic fibres indicates ordered micellar texture. *Histochemistry* 77, 1 (1983).
26. SCHMIDT, W. J.: Die Doppelbrechung von Karyoplasma, Zytoplasma und Metaplasma. Borntraeger, Berlin, 1937.
27. AARON, B. B.—GOSLINE, J. M.: Optical properties of single elastic fibres indicate random protein conformation. *Nature* 287, 865 (1980).
28. ROMHÁNYI, GY.—BUKOVINSZKY, A.—DEÁK, GY.: On the ultrastructure and proteolytic sensitivity of acetylcollegen as studied by topo-optical reactions. *Acta Morph. Acad. Sci. Hung.* 20, 49 (1972).

MELLÉKLET





a)



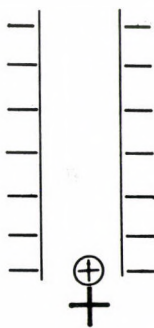
b)

1. ábra. Aorta metszete: a) fenollal lefedve, b) szulfatálás után fenollal lefedve. a)-ban a kollagénrostok erős (hosszra negatív) kettős törést mutatnak; b)-ben a kollagénrostok izotropok, s ezért jól láthatók a hullámos lefutású, enyhén kettőtörő rugalmas rostok



additív

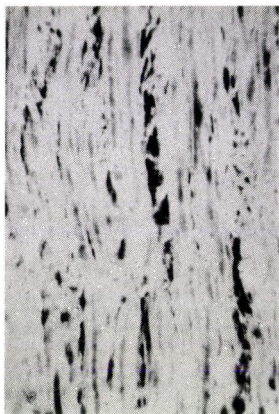
a)



inverzív

b)

2. ábra. Kongóvírőssel festett kollagénrostok topooptikai reakciói kanadabalzsammal (a) és gumiarábikummal (b) lefedve

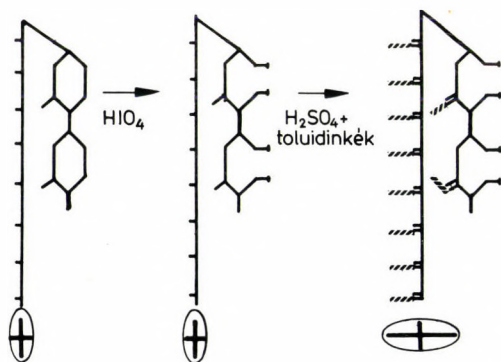


a)

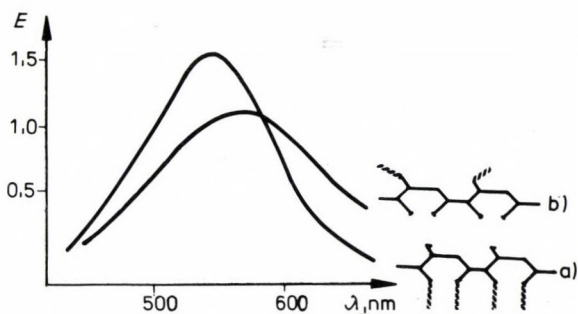


b)

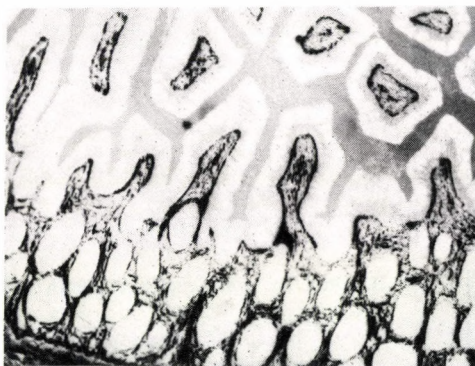
3. ábra. Ligamentum nuchae metszete, kongóvörös festéssel: a) kanadabalzsammal lefedve, b) gumiarábikummal lefedve. a)-ban a kollagénrostok intenzív kettős törése a festékmolekulák felszínrel párhuzamos elrendeződésére utal. A rugalmas rostok, a kettősen törő kollagénrostok között alig sejthetők. b)-ben a kollagénrostok inverzív reakciójuk miatt izotroppá váltak, így a rugalmas rostok jellegzetes, háromkötegű anizotrópiájukkal tűnnek fel (lásd még a 9. és a 10. ábrát)



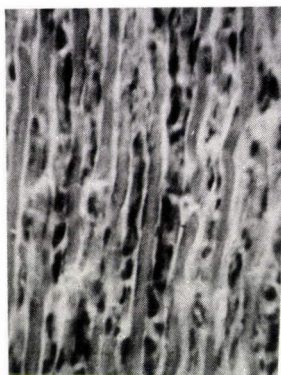
4. ábra. Perjódsvas előkezelés és szulfatálás utáni toluidinkék festés reakciómechanizmusa kollagénrostokon



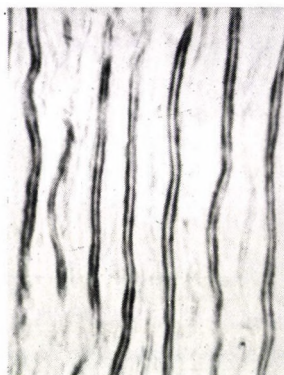
5. ábra. A toulidinkék metakromázia molekuláris mechanizmusának vázlatja. a)-ban a poliszacharidláncon az 0,5 nm-en belüli közelségben levő vicinális OH-csoportokhoz kötött festékmolekulák, párhuzamosan asszociálva, metakromáziás effektust idéznek elő, ezt mutatja az elnyelési görbe eltolódása a rövid hullámhossz felé. (A toluidinkék festés perjódsv-bisulfid előjezelés, *ABT* reakció után történt; lásd még a 17. ábrát.) b)-ben a poliszacharidlánc toulidinkék festés után ortokromáziás, mert a C-6-on kötött festékmolekulák egymástól távol esnek, és nem asszociálódhatnak párhuzamosan. A vicinális OH-csoportok előzetes perjódsvas kezelés után már nem vesznek részt a szulfatálásban, csak a C-6-on levő csoportok



6. ábra. Bélyákhártya biopsiás anyagból. A bolyhok basal-membránjának szelektív topooptikai feltüntetése a 4. ábrán vázolt kollagénspecifikus reakció által



a)



b)

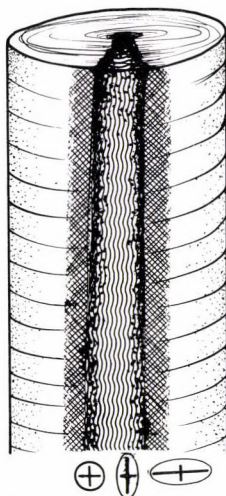
7. ábra. Újszülött aortájának metszete: a) fenolban, b) anilinben. a)-ban a kettőtörő kollagénrostok között sejthetők a rugalmas rostok. b)-ben a kollagénrostok izotropok, a rugalmas rostok intenzív kettős törést mutatnak, tengelyükben jellegzetes izotrop (sötét) kompenzációs sávval, amelynek keletkezését a 8. ábra szemlélteti



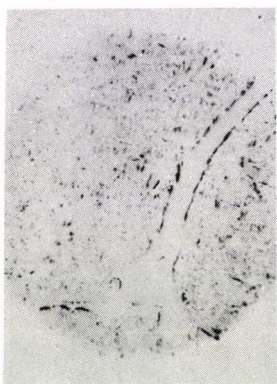
8. ábra. Az aorta rugalmas rostok mikrostruktúrájának vázlata. A rostok tengelyében húzódó izotrop sáv az egymást keresztező micelláris hálózat optikai kompenzációja révén jön létre



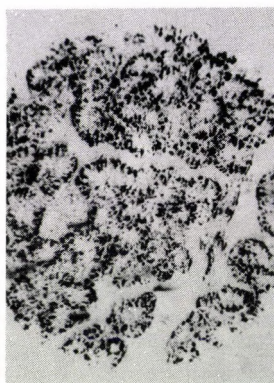
9. ábra. Ligamentum nuchae rostok anilinben jellegzetes háromkötegű anizotropiát mutatnak, amelynek ultrastrukturális vázlatát a 10. ábra szemlélteti



10. ábra. Ligamentum nuchae rostok szerkezetének vázlata

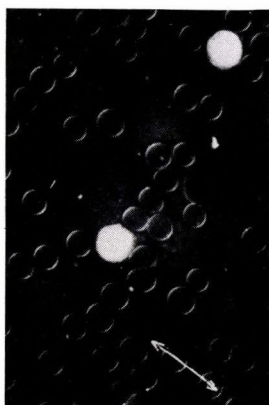


a)

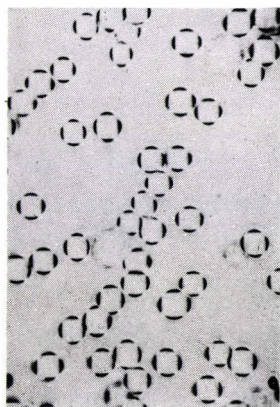


b)

11. ábra. Kutya pankreas paraffin metszete, rivanollal festve: a) festés után gumiarábikummal lefedve, b) festés után ferricianidos utókezeléssel, ami az orientált és intenzív anizotrópiát okozó festékkötődés stabilizálja. a)-ban a stabilizálás hiánya miatt optikai effektus nem látható

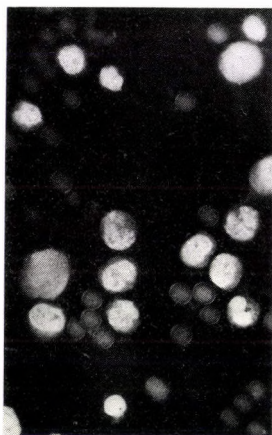


a)

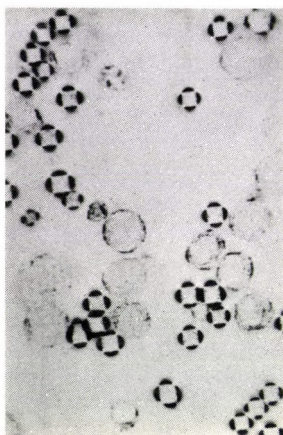


b)

12. ábra. Emberi vérkenet. Toulidinkék festés, ferricianidos utókezelés. a) Fénymikroszkópos kép. A megvilágító fény polarizációs síkja nyíllal jelölve. b) Ugyanazon terület keresztezett polárokkal. a)-ban a vörösvérsejt membránok radiális pozitív dikroizmusa látható: a membránok két szemközt lévő szektora sötét. Minthogy a festékmolekulák fényelnyelési síkja párhuzamos a fény polarizációs síkjával, ezért a festékmolekulák radiális módon rendezettek a membránban. b)-ben a vörösvérsejtek membránja intenzív kettős törést mutat, míg a látótérben levő két limfoid sejt nem mutat ilyen membráneffektust



a)

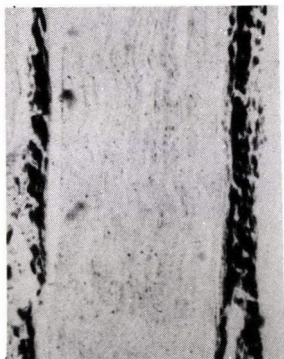


b)

13. ábra. Csontvelő kenet. Toulidinkék festés, ferricianidos utókezelés. a) Felismerhető a vörösvértest membránok dikroikus festődése. b) Ugyanazon látótér keresztezett polárok között. Míg a vörösvérsejt membránok intenzív kettős töréssel tűnnek fel, addig a mieloid sejtelemek rendkívül gyenge membráneffektust sejtetnek

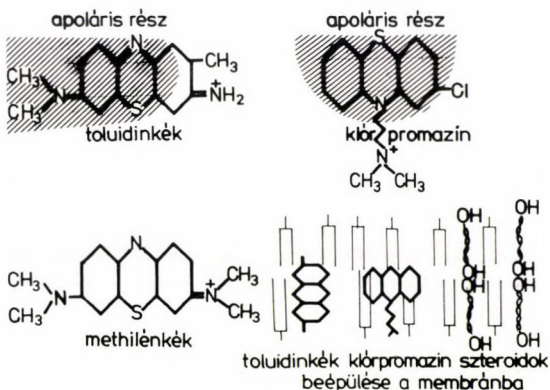


a)

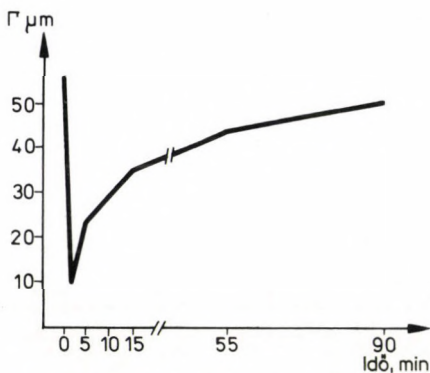


b)

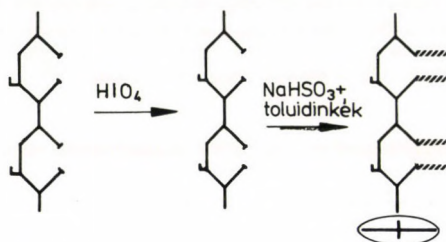
14. ábra. Periferiás ideg fagyasztott metszete: a) vízben, b) klórpromazin (hibernal) oldatban. a)-ban a velősburkok intenzív kettős törése látható; b)-ben a velősburkok kettős törése izotropiáig csökkent, a klórpromazin-molekuláknak a lipoidmolekulák közé való haránt irányú beilleszkedése folytán (lásd még a 15. ábrát)



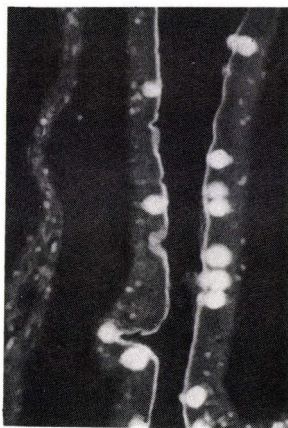
15. ábra. Klórpromazin- és toluidinék-molekulák lipid zsírsavláncok közé történő beépülésének szemléltetése



16. ábra. A velősburok klórpromazin-reakciója reverzibilis. Kimosással az eredeti kettős törés újra visszaalakul



17. ábra. Poliszacharidláncok topooptikai reakciója aldehid-bis-szulfít-toluidinkék (ABT) reakcióval. A perjódsavas kezelés hatására a vicinális OH-csoportok aldehiddé alakulnak, amelyek megkötik a biszulfítot és negatív töltést kapnak, így nagyfokú bazofília alakul ki. A megkötött toluidinkék-molekulák orientált kötődése folytán intenzív, a lánchosszra negatív jellegű kettős törés alakul ki

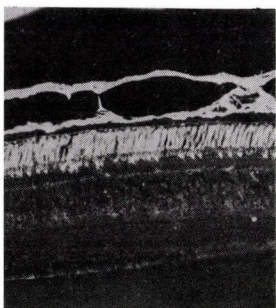


a)



b)

18. ábra. Vékonybél biopsia. *ABT* reakció: a) Fénymikroszkópos kép. b) Ugyanaz a terület keresztezett polárokkal. A felszínen néhány kehelysejt mellett az intenzív reakciót mutató mikrobolyhos réteg látható, amely intenzív kettős törést mutat, a poliszacharid molekuláris komponens nagyfokú rendezettségére utalóan

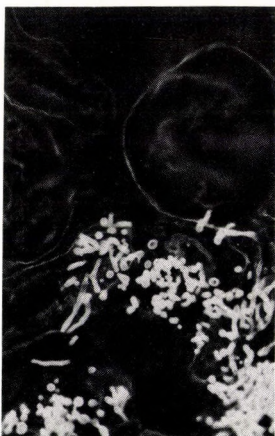


a)

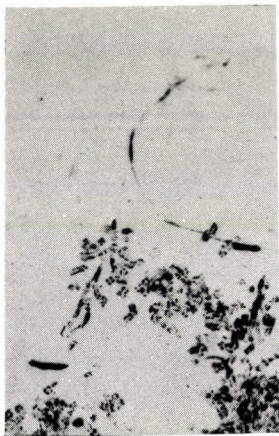


b)

19. ábra. Béka retina, formalinban rögzített és paraffinba beágyazott metszete. *ABT* reakció. a)-ban a retina pálcák intenzív reakciót mutatnak, a rhodopsin oligoszacharidtartalma folytán. b)-ben a pálcák intenzív kettős törése észlelhető, ami a rhodopsinmolekulák nagyfokú molekuláris orientációjára utal



a)



b)

20. ábra. *Candida albicans*sal inficiált kísérleti állat veséje. Paraffin metszet. *ABT* reakció. Fénymikroszkóposan a gombafonalak intenzív reakciót mutatnak, és intenzív kettős törésűek, a sejtfalakba épült poliszacharidváz nagyfokú molekuláris rendezettségére utalva

